

DOI:10.11686/cyxb2024479

http://cyxb.magtech.com.cn

唐璎, 刘晓静. 基于高分辨质谱法的甘肃青贮紫花苜蓿真菌毒素污染特征. 草业学报, 2025, 34(11): 81-97.

TANG Ying, LIU Xiao-jing. Characteristics of mycotoxin contamination in silage alfalfa from Gansu as determined by high-resolution mass spectrometry. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(11): 81-97.

基于高分辨质谱法的甘肃青贮紫花苜蓿 真菌毒素污染特征

唐璎, 刘晓静*

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为了解甘肃省内青贮紫花苜蓿饲料中真菌毒素污染状况,本研究采用超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap HRMS),通过优化色谱、质谱条件,选择凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)与固相萃取(solid-phase extraction, SPE)双重净化模式降低基质效应,对甘肃省内14个地(州、市)84个取样点的青贮紫花苜蓿饲料中18种真菌毒素进行了检测。结果显示:本研究中优化后的UPLC-Q-Orbitrap HRMS可一次性精准检验青贮紫花苜蓿中18种真菌毒素。甘肃省内青贮紫花苜蓿中检出率较高的真菌毒素分别是黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)、黄曲霉毒素B2(aflatoxin B2, AFB2)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、伏马毒素B1(fumonisin B1, FB1)、伏马毒素B2(fumonisin B2, FB2)、伏马毒素B3(fumonisin B3, FB3)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN),并且在样品检出了隐蔽型真菌毒素D3G(deoxynivalenol-3-glucoside, D3G)和15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15-ACDON)。在84个取样点中,文县、陇县地区青贮紫花苜蓿样本中检出了18种真菌毒素,其中AFB1、赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)、T-2毒素(T-2 toxin, T-2)、DON、FB1、FB2、ZEN的含量显著超出参考限值($P < 0.05$);平凉、庆阳、天水、定西、白银、兰州地区青贮紫花苜蓿样本中共有17种真菌毒素检出,主要以AFB1、AFB2、黄曲霉毒素G1(aflatoxin G1, AFG1)、黄曲霉毒素M1(aflatoxin M1, AFM1)、DON、FB1、FB2、FB3、ZEN、D3G、15-ACDON为主,其中部分地区AFB1、DON、FB1这3种真菌毒素含量超出参考限值;武威、金昌、张掖、酒泉青贮紫花苜蓿样本中检出9种真菌毒素,以AFB1、DON、FB1、ZEN为主,且均未超出参考限值;甘南迭部县、夏河县、临夏积石山县的青贮紫花苜蓿中未检出任何18种真菌毒素。甘肃境内的青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量和种类呈明显的区域性特征,本研究建立的UPLC-Q-Orbitrap HRMS可大通量、高精度一次性检验青贮紫花苜蓿中18种真菌毒素,尤其是能准确检测容易漏检的隐蔽型真菌毒素。通过Pearson相关性和冗余分析发现,青贮期平均气温和海拔是影响青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量及种类的重要因素,其解释度分别达59.70%和31.20%。

关键词:甘肃;紫花苜蓿;青贮;真菌毒素;关联性分析

Characteristics of mycotoxin contamination in silage alfalfa from Gansu as determined by high-resolution mass spectrometry

TANG Ying, LIU Xiao-jing*

College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Pratacultural Ecosystem, Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-US Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China

收稿日期:2024-12-03;改回日期:2025-03-03

基金项目:国家自然科学基金项目(32171674),兰州市人才创新创业项目(2023-RC-40)和甘肃省科技厅重点研发项目(20YF8NA130)资助。

作者简介:唐璎(1986-),女,甘肃兰州人,在读博士。E-mail: tangying8642@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liuxj@gsau.edu.cn

Abstract: This study employed ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry with optimized chromatographic and mass spectrometric conditions (UPLC-Q-Orbitrap HRMS), to investigate the contamination status of mycotoxins in silage alfalfa from Gansu Province. By optimizing chromatographic and mass spectrometric conditions and adopting a dual purification mode of gel permeation chromatography (GPC) and solid-phase extraction (SPE) to reduce matrix effects, mycotoxin levels in silage alfalfa samples from 84 sampling sites in 14 regions of Gansu Province were analysed. The results indicated that the optimized UPLC-Q-Orbitrap HRMS developed in this study could accurately and simultaneously detect 18 mycotoxins in silage alfalfa, namely: aflatoxins B1 and B2, G1 and G2 and M1 and M2 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 and AFM2, respectively), ochratoxins A, B and C (OTA, OTB and OTC, respectively), T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol (DON), fumosin B1, B2 and B3 (FB1, FB2 and FB3, respectively), zearalenone (ZEN), deoxynivalenol-3-glycoside (D3G) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-ACDON). The most frequently detected toxins included AFB1, AFB2, DON, FB1, FB2, FB3, and ZEN, along with masked toxins such as D3G and 15-ACDON. Among the 84 sampling sites, all 18 mycotoxins were detected in samples from Long County and Wen County, with AFB1, OTA, T-2, DON, FB1, FB2, and ZEN significantly exceeding reference tolerance limits ($P < 0.05$). In Pingliang, Qingyang, Tianshui, Dingxi, Baiyin and Lanzhou, 17 mycotoxins were detected, primarily AFB1, AFB2, AFG1, AFM1, DON, FB1, FB2, FB3, ZEN, D3G and 15-ACDON, with 3 mycotoxins (AFB1, DON, FB1) exceeding reference tolerance limits. In Wuwei, Jinchang, Zhangye, and Jiuquan, 9 toxins were detected, primarily AFB1, DON, FB1, and ZEN, all within reference tolerance limits. No mycotoxins were detected in samples from Diebu County, Xiahe County, Jishishan County in the Gannan and Linxia regions. This study demonstrates that the developed UPLC-Q-Orbitrap HEMS method enables high-throughput, highly accurate detection of 18 mycotoxins in silage alfalfa, including masked mycotoxins that are prone to being overlooked. Mycotoxin concentrations and types in Gansu ensiled alfalfa exhibited distinct regional characteristics. Pearson correlation and redundancy analysis revealed that average temperature during the ensiling period and altitude were the significant factors influencing mycotoxins content and types, with explanatory powers of 59.70% and 31.20%, respectively.

Key words: Gansu; alfalfa; silage; mycotoxins; association analysis

我国是青贮饲料生产和消费的大国,近年来关于青贮饲料中真菌毒素污染已广泛引起畜牧生产者的重视^[1],根据联合国粮食与农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)的数据,全球每年约有1/4的青贮饲料作物受到不同程度的真菌毒素污染,其中大约2%的饲料作物污染严重,导致直接浪费,经济损失可达数亿美元^[2]。在我国,青贮饲料中真菌毒素的检出率70%~100%^[3]。甘肃是紫花苜蓿(*Medicago sativa*)种植及青贮饲料生产的主产地之一,生产实践中紫花苜蓿因蛋白含量高,在青贮过程中更容易积累真菌毒素^[4]。当家畜食用被真菌毒素污染的青贮饲料时,可能会导致其肝细胞DNA损伤和细胞中毒,并且真菌毒素会随食物链进入人体,如果青贮饲料中真菌毒素污染严重,家畜摄入量过高甚至会对自身和人类的健康产生危害,引发肝脏、肾脏和胃肠道的病变,抑制生长,并可能导致癌症、畸形和突变等严重后果^[5]。青贮饲料中的真菌毒素普遍被认为受温度、湿度、地域等多种地理气候因素影响^[6-7]。研究发现,我国西南湿热地区青贮饲料真菌毒素含量高于其他地区,在青贮时温度、湿度是影响青贮饲料真菌毒素含量的主要因素^[1]。另有研究认为,青贮过程中打捆密度和堆垛方式也影响青贮饲料中真菌毒素含量^[8]。同时,研究还发现青贮过程中微生物群落差异导致代谢物差异,从而影响真菌毒素积累^[9],而地理气候因素又影响了微生物群落的组成^[10]。甘肃位于青藏高原、内蒙古高原和黄土高原的交界区域,拥有广阔的地域和丰富多样的地理气候特征^[11]。主要有河西干旱灌溉农业区,陇中、陇东雨养农业区,陇南湿热农业区以及高寒山地农业区四大农业区域,各区域环境条件迥异,从而造就了各不相同的饲料青贮环境^[10]。Fan等^[12]调查甘肃青贮紫花苜蓿中黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)含量,发现检出率高

达43.4%。然而目前对甘肃青贮紫花苜蓿中真菌毒素污染研究仅在少数区域,且仅可检测有限的几种真菌毒素。因此,深入开展甘肃各地青贮紫花苜蓿中真菌毒素污染状况的研究非常必要。

研究表明,青贮紫花苜蓿中存在的主要真菌毒素污染包括:黄曲霉毒素(aflatoxins, AF)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素(ochratoxins, OT)、单端孢霉烯族毒素(如HT-2和T-2毒素)、伏马毒素(fumonisin, FB)以及隐蔽型真菌毒素等多种类型^[13-15],现阶段针对青贮饲料中真菌毒素的常用检测方法,如:酶联免疫法、气相-液相色谱技术的经典方法^[16-20]。虽然能够检测真菌毒素,但存在一次可检测成分少的缺点,且灵敏度较低,易出现假阳性,尤其对难检测的隐蔽型真菌毒素常漏检、误检。超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra-performance liquid chromatography quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap HRMS)通量高,质谱分辨率高,可以准确检测衍生结合型化合物,目前主要用于医药和食品领域,如曹依敏等^[21]采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS法实现了一次性对中药材中100多种农药残留进行检测,冯峰等^[22]采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术对食品中非法添加物的研究中准确高效地检测出107种那非类非法添加物。此方法相较于经典色谱法,灵敏度高、通量大、前处理简便、有良好的准确度,但尚未在青贮饲料真菌毒素污染的检测中应用。

为了研究甘肃各区域青贮紫花苜蓿中真菌毒素污染的特征及其重要影响因子,精细化调控青贮紫花苜蓿品质,本研究拟在青贮紫花苜蓿真菌毒素检测中采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS法,对甘肃境内不同区域青贮紫花苜蓿中常见真菌毒素和隐蔽型真菌毒素等多种真菌毒素展开精准检测,旨在了解甘肃青贮紫花苜蓿真菌毒素污染状况,剖析影响青贮紫花苜蓿中真菌毒素污染的关键因素,为调控青贮紫花苜蓿饲喂安全提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 采样区域及采样方法

试验材料为青贮紫花苜蓿,紫花苜蓿品种主要为甘农3号、甘农5号、陇东苜蓿、中苜1号。2023年10月(青贮时间约为48 d)采集于甘肃14个市(州)大规模青贮生产基地,每个市(州)选择具有代表性的2个县(区),每个县(区)设3个取样点,共计84个取样点,每个取样点重复取样3次,共采集252份样品。每次取样去除表层20 cm处青贮饲料,采用5点采样法(上、下、左、右、中)取样,再充分混合后,称取1.5 kg为1个处理。地理气候因子数据来自中国气象科学数据中心(<https://data.cma.cn/>)(表1)。

1.2 材料与试剂

18种真菌毒素标准品:黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2、黄曲霉毒素M1、黄曲霉毒素M2、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A、赭曲霉毒素B、赭曲霉毒素C、伏马毒素B1、伏马毒素B2、伏马毒素B3、T-2毒素、HT-2毒素、D3G毒素、15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇,以上标准品纯度均大于99.0%,购自德国Dr. Ehrensterfer GrmbH公司。标准溶液配制参考曹依敏等^[21]的方法。

1.3 仪器与设备

UPLC-Q-Orbitrap HRMS: Acquity型超高效液相色谱仪(美国Waters公司)搭载Q-Exactive型高分辨质谱仪(美国赛默飞生物科技公司),凝胶渗透色谱(GPC 1515型,美国Waters公司),固相萃取(JAW-HL806,北京恒奥德仪表有限公司),全自动定量平行浓缩仪(Preplinc AccuVap,美国J2 Scientific公司),平行蒸发仪(全自动智能双模式氮吹仪)(FV64UP,广州得泰仪器科技有限公司)。

1.4 青贮饲料样品处理

青贮紫花苜蓿样品粉碎后,每类样品分别称取5.0 g(精确至0.001 g),装入50 mL离心管中,分别加入10 mL萃取溶剂[乙腈/水(70:30, V/V)(含1%甲酸)、甲醇/水(70:30, V/V)],涡旋振荡20 min,加入QuEChERS提取盐包,涡旋振荡摇散2 min,冰浴静置10 min,5000 r·min⁻¹ 4℃离心10 min,取上清液进行凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)模式净化处理。收集净化过程中的10.0~16.4 min的流出液,通过平行浓缩蒸发仪将其直接浓缩至1.5 mL后,转移至固相萃取萃取系统(solid-phase extraction, SPE)进行进一步净化。以多毒素免疫亲和柱前处理样品做对比。

表 1 甘肃不同采样区域地理气候因子信息

Table 1 Information of sampling sites in different regions of Gansu

取样点 Sampling site	样品来源 Sample source	编号 Number	EN	E (m)	MAT (°C)	MAXTS (°C)	MINTS (°C)	MAH (%)
陇南市文县 Wen County, Longnan City	甘肃生源牧业有限公司 Gansu Shengyuan Animal Husbandry Co.	LW	104.68°, 32.94°	1135	31.0	36.2	23.2	69.36
陇南市陇县 Long County, Longnan City	陇南市美达牧业有限责任公司 Longnan Meida Herding Co.	LL	104.92°, 33.40°	1024	31.7	35.8	22.8	66.04
庆阳市环县 Huan County, Qingyang City	庆城牧草合作社 Qingcheng Forage Cooperative	QH	107.33°, 37.07°	1555	26.9	31.2	16.4	53.43
庆阳市西峰区 Xifeng District, Qingyang City	克劳沃草业有限公司 Crawford Grass Industry Co.	QX	107.88°, 36.63°	1421	26.7	30.8	15.6	52.31
平凉市崇信县 Chongxin County, Pingliang City	崇信宏达草业有限公司 Chongxin Hongda Grass Industry Co.	PC	107.05°, 35.27°	1406	25.1	30.4	14.4	50.47
平凉市泾川县 Jingchuan County, Pingliang City	泾川县丰达草业有限公司 Jingchuan Fengda Grass Industry Co.	PJ	107.38°, 35.31°	1395	25.4	31.2	13.8	60.37
天水市武山县 Wushan County, Tianshui City	武山县东牧饲草有限公司 Wushan Lemu Forage Co.	TW	104.88°, 34.69°	1542	25.1	30.9	13.1	60.46
天水市秦州区 Qinzhou District, Tianshui City	秦远种养殖农民专业合作社 Qinyuan Breeding Farmers Cooperative	TQ	105.69°, 34.60°	1650	25.0	30.6	13.1	59.11
定西市安定区 Anding District, Dingxi City	定西民祥草业有限公司 Dingxi Minxiang Grass Industry Co.	DA	104.57°, 35.57°	1335	24.3	30.1	12.8	53.26
定西市通渭县 Tongwei County, Dingxi City	通渭鸿泰牧业有限公司 Tongwei Hongtai Herding Company	DT	105.27°, 35.24°	1470	24.7	29.9	12.9	50.38
白银市会宁县 Huining County, Baiyin City	甘肃会丰牧草产业有限公司 Gansu Huiifeng Pasture Industry Co.	BH	105.08°, 35.72°	1650	24.2	29.7	13.0	52.85
白银市靖远县 Jingyuan County, Baiyin City	新西部草业发展有限公司 New West Grass Development Co.	BJ	104.71°, 36.54°	1758	24.9	29.6	13.1	50.31
兰州市榆中县 Yuzhong County, Lanzhou City	甘肃杨柳牧草饲料公司 Gansu Yangliu Herbage Feeding Company	LY	104.09°, 35.87°	1519	24.3	30.2	13.5	49.13
兰州新区 Lanzhou New District	秦川农业投资发展有限公司 Qinchuan Agricultural Investment Development Co.	LX	103.25°, 36.73°	1710	24.3	30.1	13.6	42.70
武威市凉州区 Liangzhou District, Wuwei City	亚盛田园牧歌草业有限公司 Yasheng Field and Pasture Grass Co.	WL	102.61°, 37.94°	2600	18.7	28.3	9.9	38.15
武威市民勤县 Minqin County, Wuwei City	民勤新希望草产品开发有限公司 Minqin New Hope Grass Development Co	WM	103.08°, 38.62°	2400	19.8	28.1	9.6	41.25
金昌市永昌县东寨镇 Dongzhai Town, Yongchang County, Jinchang City	甘肃中农草业科技有限公司 Gansu Zhongnong Grass Technology Co.	JYD	101.73°, 38.21°	2440	19.4	27.9	9.2	48.37
金昌市永昌县水源镇 Shuiyuan Town, Yongchang County, Jinchang City	甘肃杨柳青牧草饲料开发有限公司 Gansu Yangliuqing Forage Development Co.	JYS	101.64°, 38.39°	2494	18.4	27.8	8.9	45.32
张掖市高台县 Gaotai County, Zhangye City	大业草业有限公司 Daye Grass Industry Co.	ZG	99.84°, 40.14°	2200	18.1	28.3	8.4	47.34
张掖市山丹县 Shandan County, Zhangye City	大业草业有限公司 Daye Grass Industry Co.	ZS	99.57°, 39.06°	2850	17.8	28.4	8.6	45.35
张掖市民乐县 Minle County, Zhangye City	民乐龙腾饲草料加工厂 Minle Longteng Forage Processing Plant	ZM	100.85°, 38.43°	2708	17.5	27.5	8.9	39.31
酒泉市金塔县 Jinta County, Jiuquan City	亚盛田园牧歌草业有限公司 Yasheng Field and Pasture Grass Co.	JJ	98.92°, 39.97°	2275	17.3	28.3	8.8	37.47
酒泉市玉门市 Yumen City, Jiuquan City	大业牧草饲料有限责任公司 Daye Pasture Feed Co.	JY	97.58°, 39.81°	2600	17.9	27.5	8.2	35.06
酒泉市瓜州县 Guazhou County, Jiuquan City	大业牧草饲料有限责任公司 Daye Pasture Feed Co.	JG	95.77°, 42.51°	2177	17.8	28.5	8.2	31.39
酒泉市敦煌市 Dunhuang City, Jiuquan City	大业牧草饲料有限责任公司 Daye Pasture Feed Co.	JD	94.71°, 41.11°	2139	17.9	28.2	8.1	32.63
甘南州迭部县 Diebu County, Gannan Prefecture	迭部县草业公司 Diebu County Grass Industry Company	GD	103.23°, 34.08°	3055	12.5	24.1	4.3	35.21
甘南州夏河县 Xiahe County, Gannan Prefecture	夏河县永杰草畜有限责任公司 Xiahe County Yongjie Grass Animal Limited Liability Company	GX	102.46°, 34.21°	3400	10.6	23.2	4.2	36.21
临夏州积石山县 Jishishan County, Linxia Prefecture	积石山兴禹草业公司 Jishishan Xingyu Grass Industry Co.	LJ	102.85°, 34.74°	3047	10.5	23.4	3.9	33.19

EN: 经纬度 Longitude (E), Latitudes (N); E: 海拔 Elevation; MAT: 青贮期平均气温 Average temperature in the silage; MAXTS: 青贮期最高温度 Maximum temperature in the silage; MINTS: 青贮期最低温度 Minimum temperature in the silage; MAH: 青贮期相对湿度 Relative humidity in the silage. 下同 The same below.

1.5 仪器分析条件

1.5.1 质谱条件 质谱分析条件如下:采用电喷雾正离子离子源模式(ESI⁺),二级质谱扫描(Full MS/ddMS²)监测方式。电喷雾电压设定为3.4 kV,毛细管的温度为322℃,S-lens的射频水平为54.0。一级质谱的参数:分辨率为80000 FWHM,自动增益控制设置为 3×10^6 ,扫描范围为质荷比(m/z) 70~1050。二级质谱的参数:分辨率为17000 FWHM,自动增益控制为 1×10^5 ,归一化碰撞能量分别为20、40和60,母离子强度触发阈值为 8.3×10^4 。

1.5.2 色谱条件 使用Waters Atiantis® T3 C18色谱柱(160 mm×2.2 mm, 3.4 μm)进行分离。流动相A为含0.1%甲酸铵的5 mmol·L⁻¹甲酸水溶液,流动相B为含0.1%甲酸铵的5 mmol·L⁻¹甲酸甲醇溶液。梯度洗脱程序如下:0~1 min保持97%A;1~4 min由97%逐渐降低至45%A;4~8 min由45%逐渐降低至34%A;8.0~8.5 min由34%降低至30%A;8.5~9.0 min由30%降低至23%A;9~16 min由23%降低至6%A;16~20 min保持在6%A。流速设定为0.3 mL·min⁻¹,柱温保持在42℃,进样体积为3 μL。以现行标准GB/T 30955-2014^[23]为对照,进行优化后分析条件对比。

1.6 不同水平添加回收试验

根据质谱Full MS/ddMS²模式下响应不同,向青贮紫花苜蓿空白基质样品中分别添加18种真菌毒素混合标准溶液,添加浓度水平依据每种真菌毒素的线性范围设定,共设定了1、2、5、10、20、50、100、1000和10000 μg·kg⁻¹这9个浓度级别,每个浓度水平进行6次重复试验。并计算相关系数、回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。同时,检出限的确定是基于基质标准曲线的y轴截距除以斜率标准偏差的3倍标准。

1.7 数据处理

使用Trace Finder 4.1数据处理软件(美国赛默飞生物科技公司)对原始采集数据进行提取统计,并配合SPSS(26.0版)、Origin(2024版)软件进行数据统计学分析和可视化。

2 结果与分析

2.1 优化后质谱条件

本研究采用流动注射技术,对18种真菌毒素进行全扫描和Full MS/ddMS²。以强响应的内源裂解离子作为母离子。以响应度较高且质量数大于100的离子作为子离子,同时使用MS search v. 2.3软件(美国赛默飞生物科技公司)计算子离子的理论精确质量数。真菌毒素的定性及定量质谱参数参考欧盟《质谱分析方法鉴定参数》2006/576/EC法规^[24]要求,阳性结果必须满足以下条件:与标准数据库中目标化合物的母离子及子离子的精确质量数偏差 $\leq 5 \times 10^{-6}$,至少1个子离子精确质量偏差 $\leq 5 \times 10^{-6}$,保留时间窗口为 ± 15 s,最终确定18种真菌毒素质谱参数(表2)。

2.2 优化后色谱条件

研究选择对多组分分离效果好的3种色谱柱,分别是Waters Atiantis® T3 C18(160 mm×2.2 mm, 3.4 μm)、Agilent Poroshell 120 EC-18(160 mm×2.2 mm, 2.8 μm)、Waters XBridge BEH C18(110 mm×2.2 mm, 2.7 μm)对18种真菌毒素进行分离,隐蔽性真菌毒素D3G容易出现假阴性,以青贮紫花苜蓿中D3G毒素为例,结果显示,D3G毒素在Waters XBridge BEH C18柱上出现明显拖尾现象(图1),在Waters Atiantis® T3 C18和Agilent Poroshell 120 EC-18柱上峰型良好,而前者峰型更尖锐,峰宽更窄。因此选择峰型更好的Waters Atiantis® T3 C18为本方法推荐的色谱柱。

比较基础溶液相同,加或不加0.1%甲酸铵溶液的两种流动相对18种真菌毒素分离情况,隐蔽真菌毒素(D3G)对色谱条件敏感,继续以青贮紫花苜蓿中D3G毒素为例,结果显示,当流动相中含甲酸铵时,D3G毒素的峰型尖锐,无拖尾,响应高(图1),流动相中不含甲酸铵时,D3G色谱峰出现拖尾、灵敏度降低、响应弱。因此选择含0.1%甲酸铵的甲酸-甲酸甲醇作为该方法的流动相。应用色谱柱Waters Atiantis® T3 C18,流动相添加0.1%甲酸铵溶液,18种真菌毒素总离子流见图2。

表2 18种真菌毒素质谱参数

Table 2 Mass spectrometry parameters for 18 mycotoxins

简称 Abbreviation	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	母离子加合形式 Precursor ion adduct form	精确质量数偏差 Exact mass deviation ($\times 10^{-6}$)	保留时间 Retention time (min)	质荷比 Mass-charge ratio (m/z)	
						母离子 Precursor ion	子离子 Fragment ions
AFB1	黄曲霉毒素 B1 Aflatoxin B1	$C_{17}H_{12}O_6$	$[M+H]^+$	1.47	9.06	313.0702	284.0228, 256.0129
AFB2	黄曲霉毒素 B2 Aflatoxin B2	$C_{17}H_{14}O_6$	$[M+H]^+$	-0.04	9.53	315.0858	287.0912, 259.0621
AFG1	黄曲霉毒素 G1 Aflatoxin G1	$C_{17}H_{12}O_7$	$[M+H]^+$	0.80	10.08	329.0657	200.0466, 214.0623
AFG2	黄曲霉毒素 G2 Aflatoxin G2	$C_{17}H_{14}O_7$	$[M+H]^+$	1.85	10.44	331.0807	286.1880, 258.5701
AFM1	黄曲霉毒素 M1 Aflatoxin M1	$C_{17}H_{12}O_6$	$[M+H]^+$	0.05	10.96	329.0650	273.0757, 259.0601
AFM2	黄曲霉毒素 M2 Aflatoxin M2	$C_{17}H_{14}O_7$	$[M+H]^+$	1.13	11.08	331.0824	313.0758, 285.0801
OTA	赭曲霉毒素 A Ochratoxin A	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	$[M+H]^+$	0.32	12.74	404.0890	358.0841, 257.0211
OTB	赭曲霉毒素 B Ochratoxin B	$C_{20}H_{19}NO_6$	$[M+H]^+$	1.04	13.21	370.1280	239.1363, 211.1445
OTC	赭曲霉毒素 C Ochratoxin C	$C_{22}H_{22}ClNO_6$	$[M+H]^+$	2.18	13.73	431.1135	278.1683, 345.1940
T-2	T-2毒素 T-2 toxin	$C_{24}H_{34}O_9$	$[M+Na]^+$	-0.83	12.38	467.2276	305.1384, 245.1172
HT-2	HT-2毒素 HT-2 toxin	$C_{22}H_{32}O_8$	$[M+Na]^+$	0.51	11.76	425.2164	263.1277, 245.1172
DON	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol	$C_{15}H_{20}O_6$	$[M+Na]^+$	-0.62	6.43	297.1327	249.1121, 203.1067
FB1	伏马毒素 B1 Fumonisin B1	$C_{34}H_{59}NO_{15}$	$[M+H]^+$	1.12	14.41	722.3952	546.3616, 352.3183
FB2	伏马毒素 B2 Fumonisin B2	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	$[M+H]^+$	0.73	15.03	706.4003	530.3661, 336.3234
FB3	伏马毒素 B3 Fumonisin B3	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	$[M+H]^+$	1.89	14.79	706.4003	688.3903, 354.3341
ZEN	玉米赤霉烯酮 Zearalenone	$C_{18}H_{22}O_5$	$[M+H]^+$	1.35	13.14	319.1541	283.1329, 267.0851
D3G	D3G毒素 Deoxynivalenol-3-glucoside	$C_{21}H_{30}O_{11}$	$[M+H]^+$	1.92	14.17	459.1885	297.1333, 249.1121
15-AC-DON	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$C_{17}H_{22}O_7$	$[M+H]^+$	1.28	9.89	339.1438	261.1121, 231.1016

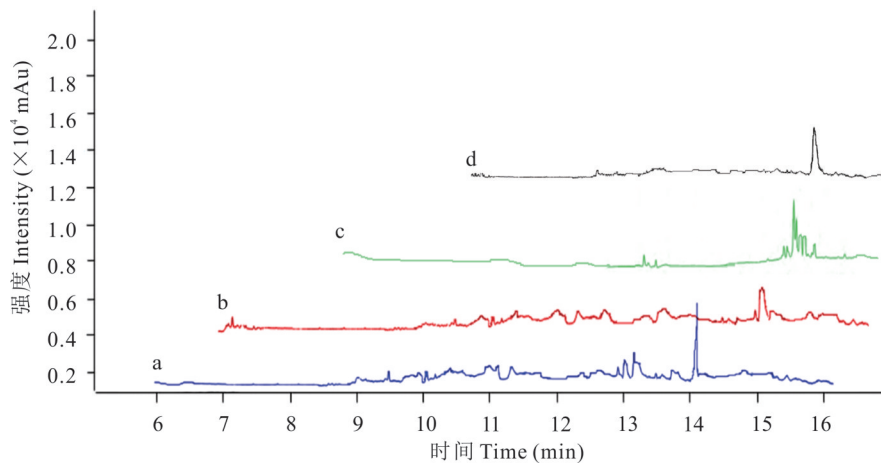


图1 不同色谱条件下 D3G 毒素色谱

Fig. 1 Chromatograms of D3G toxin under different chromatographic conditions

a: Waters Atantis® T3 C18, 流动相 Mobile phase: 加 0.1% 甲酸铵 Add 0.1% ammonium formate; b: Agilent Poroshell 120 EC-18, 流动相 Mobile phase: 加 0.1% 甲酸铵 Add 0.1% ammonium formate; c: Waters XBridge BEH C18, 流动相 Mobile phase: 加 0.1% 甲酸铵 Add 0.1% ammonium formate; d: Waters Atantis® T3 C18, 流动相 Mobile phase: 未加 0.1% 甲酸铵 No addition of 0.1% ammonium formate.

2.3 方法验证

2.3.1 去除样品基质效应 本研究建立的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 法采用与基质匹配的标准溶液进行校准定量, 针对青贮紫花苜蓿样品成分消除基质效应。如图 3 所示, 当选择 GPC 与 SPE 双重净化模式对复杂基质样品进行杂质净化, 并采用与基质匹配的 15-ACDON 标准溶液进行检测时, 色谱图峰型尖锐, 没有拖尾。而未处理的 15-ACDON 标准溶液色谱图, 干扰峰多, 有拖尾现象。

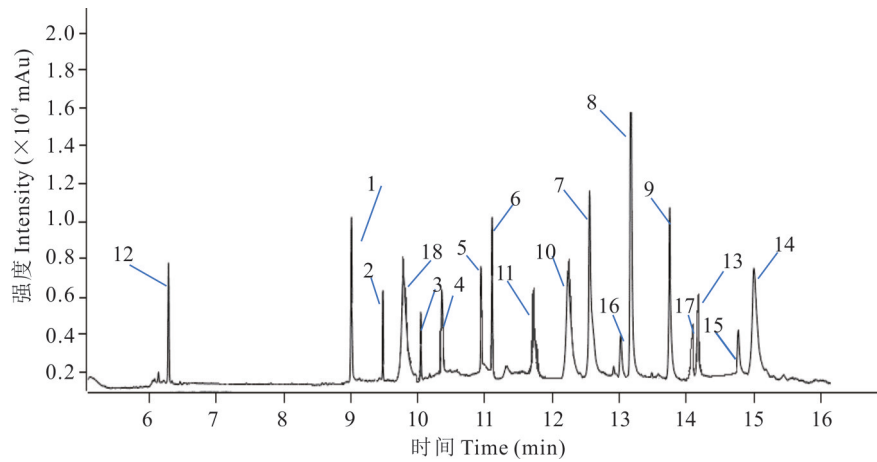


图 2 优化色谱质谱条件后 18 种真菌毒素总离子流

Fig. 2 Total ion chromatogram of 18 mycotoxins after optimization of detection conditions

1: AFB1; 2: AFB2; 3: AFG1; 4: AFG2; 5: AFM1; 6: AFM2; 7: OTA; 8: OTB; 9: OTC; 10: T-2; 11: HT-2; 12: DON; 13: FB1; 14: FB2; 15: FB3; 16: ZEN; 17: D3G; 18: 15-ACDON.

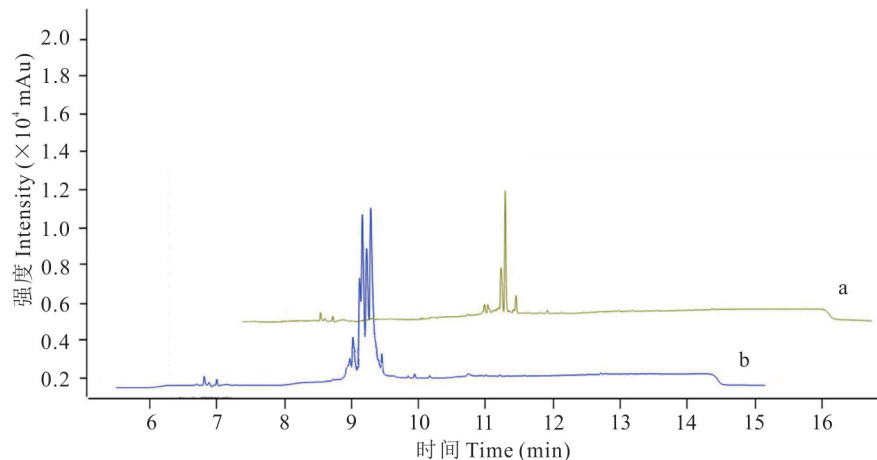


图 3 采用基质匹配标准溶液条件下 15-ACDON 色谱

Fig. 3 The chromatogram of 15-ACDON under the conditions of matrix-matched standard solutions

a: 与基质匹配的标准溶液 Matrix-matched standard solution; b: 未处理的标准溶液 Untreated standard solution.

2.3.2 方法学验证参数 18 种真菌毒素在青贮紫花苜蓿中测试浓度范围内线性良好, 相关系数均大于或等于 0.9992, 检出限为 $0.20 \sim 7.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (表 3)。为验证本方法准确度和精密度, 在 1、2、5、10、20、50、100、1000 和 10000 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 这 9 个添加水平下, 青贮紫花苜蓿中进行加标回收试验, 并计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。结果表明 (表 3), 18 种真菌毒素青贮紫花苜蓿基质中加标回收率为 $80.21\% \sim 104.83\%$, RSD 为 $1.23\% \sim 10.74\%$ 。

2.4 甘肃省不同区域青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量及类型

采用建立的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 法检测 252 份青贮紫花苜蓿样品, 如表 4 所示, 甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中检出率较高的真菌毒素分别是 AFB1、AFB2、DON、FB1、FB2、FB3、ZEN。参照文献 [1], 其中 89.29% 的样品中检出 AFB1, 含量为 $3.43 \sim 117.83 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有 50% 的样品中 AFB1 超出参考限值。有 225 份样品检出 DON, 含量为 $415.78 \sim 6613.75 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其中 28.57% 的样品中 DON 超出参考限值。FB1 的含量为 $275.80 \sim 109651.35 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 21.43% 的样品超出参考限值。225 份样品中检出 ZEN, 含量为 $5.14 \sim 2372.59 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 17.86% 的样品超出参考限值。分别在 126 份样品检出隐蔽型真菌毒素 D3G, 108 份样品中检出隐蔽型真菌毒素 15-ACDON。

表3 18种真菌毒素线性范围、相关系数、检出限、定量限、回收率、精密度

Table 3 Linear range, correlation coefficient, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), recoveries and precision ($n=6$) of 18 mycotoxins

真菌毒素 Mycotoxin	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Limit of detection (LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	定量限 Limit of quantification (LOQ, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	青贮紫花苜蓿 Silage alfalfa		相对标准偏差 Relative standard de- viation (RSD, %)
					添加量 Additive quantity ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 Recoveries (%)	
AFB1	0.5~30	0.9997	0.20	0.5	1.0	80.21	3.83
					2.0	83.42	1.94
					5.0	86.23	1.23
AFB2	0.5~30	0.9992	0.20	0.5	1.0	85.11	8.75
					2.0	86.28	4.58
					5.0	90.41	6.31
AFG1	0.5~30	0.9996	0.20	0.5	1.0	82.75	3.74
					2.0	80.53	4.57
					5.0	84.58	5.42
AFG2	0.5~30	0.9993	0.20	0.5	1.0	80.54	7.89
					2.0	84.87	8.93
					5.0	90.24	8.75
AFM1	0.5~30	0.9999	0.20	0.5	1.0	81.21	3.89
					2.0	85.36	1.93
					5.0	103.43	3.75
AFM2	0.5~30	0.9998	0.20	0.5	1.0	83.32	5.95
					2.0	89.52	9.03
					5.0	92.56	8.31
OTA	1.5~100	0.9995	0.50	1.5	2.0	80.42	6.68
					10.0	90.63	4.62
					50.0	104.83	7.53
OTB	1.5~100	0.9994	0.50	1.5	2.0	88.52	9.79
					10.0	82.48	7.94
					50.0	95.64	6.88
OTC	1.5~100	0.9997	0.50	1.5	2.0	83.57	5.72
					10.0	83.94	6.52
					50.0	90.42	4.42
T-2	8~100	0.9992	3.00	8.0	10.0	87.63	4.83
					50.0	84.84	5.02
					100.0	91.57	3.62
HT-2	8~100	0.9994	3.00	8.0	10.0	80.56	3.92
					50.0	88.93	4.03
					100.0	97.51	4.72
DON	20~100	0.9996	7.00	20.0	20.0	88.27	7.94
					50.0	83.85	8.93
					100.0	88.79	9.46
FB1	10~10000	0.9997	3.00	10.0	10.0	85.43	7.85
					100.0	83.75	5.68
					10000.0	90.77	10.74

续表 Continued Table

真菌毒素 Mycotoxin	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Limit of detection (LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	定量限 Limit of quantification (LOQ, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	青贮紫花苜蓿 Silage alfalfa		相对标准偏差 Relative standard de- viation (RSD, %)
					添加量 Additive quantity ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 Recoveries (%)	
FB2	10~10000	0.9997	3.00	10.0	10.0	88.63	6.68
					100.0	88.52	7.53
					10000.0	90.73	5.87
FB3	10~10000	0.9996	3.00	10.0	10.0	88.54	4.75
					100.0	83.43	5.42
					10000.0	88.41	6.05
ZEN	5~1000	0.9995	1.50	5.0	10.0	85.73	5.42
					100.0	89.32	5.73
					1000.0	84.65	6.74
D3G	4~100	0.9994	1.10	4.0	5.0	83.64	4.96
					20.0	84.85	3.22
					100.0	89.66	5.93
15-AC- DON	20~100	0.9996	7.00	20.0	20.0	80.63	6.74
					50.0	89.64	5.84
					100.0	84.86	7.29

表 4 甘肃不同区域青贮苜蓿成品真菌毒素普查表

Table 4 Survey of mycotoxins in silage alfalfa products from different regions of Gansu

真菌毒素 Mycotoxin	样本量 Sample number	检出比例 Detection rate (%)	超出限值比例 Exceedance ratio (%)	平均值 Average ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	中位值 Median ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	最高值 Maximum ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	参考限值 Reference limit ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
AFB1	252	89.29	50.00	36.72±1.13	25.79±1.52	117.83	30
AFB2	252	60.71	/	36.93±0.74	25.93±1.02	109.14	/
AFG1	252	53.57	/	19.18±0.63	1.27±0.36	99.59	/
AFG2	252	39.29	/	9.29±1.30	N. D.	78.73	/
AFM1	252	57.14	/	5.27±0.50	0.81±0.06	48.53	/
AFM2	252	42.86	/	6.75±0.70	N. D.	56.79	/
OTA	252	35.71	7.14	16.00±1.20	N. D.	126.79	100
OTB	252	17.86	/	6.81±0.90	N. D.	85.43	/
OTC	252	7.14	/	3.34±0.40	N. D.	51.19	/
T-2	252	14.29	3.57	49.47±2.40	N. D.	521.60	500
HT-2	252	14.29	/	4.22±1.50	N. D.	53.36	/
DON	252	89.29	28.57	2774.24±22.30	2538.05±20.23	6613.75	5000
FB1	252	89.29	21.43	32038.51±173.42	23515.82±104.53	109651.35	60000
FB2	252	71.43	7.14	9416.34±125.70	1152.98±91.53	81732.32	60000
FB3	252	64.29	/	133.41±10.81	101.32±8.53	668.94	/
ZEN	252	89.29	17.86	368.77±45.74	91.27±4.53	2372.59	1000
D3G	252	50.00	/	23.43±2.20	5.18±0.89	97.82	/
15-ACDON	252	42.86	/	35.13±3.40	N. D.	169.99	/

“/”表示无数据;N. D. 表示未检出。“/” indicates no data, “N. D.” stands for “not detected”. 下同 The same below.

表5 甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量

Table 5 Mycotoxin levels in silage alfalfa from different regions of Gansu ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

地区 Region	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1	AFM2	OTA	OTB	OTC
LW	114.61±3.22*	104.56±4.58	94.21±5.38	70.32±8.42	40.38±7.38	52.17±4.62	118.38±8.41*	79.34±5.21	48.23±2.96
LL	112.32±4.51*	100.53±3.81	90.34±5.02	64.78±8.31	43.11±5.42	50.11±5.03	107.84±7.35*	82.35±3.08	45.19±1.49
QH	87.34±2.80*	93.22±4.33	74.39±4.42	43.11±3.39	10.32±0.83	15.38±1.23	46.93±4.31	N. D.	N. D.
QX	83.26±2.23*	94.61±3.65	76.32±3.97	40.21±6.17	9.49±0.62	17.29±1.05	50.51±2.94	N. D.	N. D.
PC	80.31±4.47*	83.37±4.17	53.61±3.73	20.64±5.04	12.11±0.55	14.28±1.41	25.81±1.83	N. D.	N. D.
PJ	78.47±5.18*	84.23±3.82	50.27±2.88	14.38±2.95	10.37±0.48	15.19±1.09	23.27±2.11	N. D.	N. D.
TW	76.73±3.86*	80.34±2.81	30.48±3.51	N. D.	5.02±0.25	6.93±0.83	35.84±2.78	12.73±1.05	N. D.
TQ	60.36±2.74*	72.26±3.22	28.57±4.02	N. D.	4.66±0.84	7.89±0.69	34.96±1.94	14.32±1.63	N. D.
DA	40.82±2.33*	63.68±2.88	11.61±2.11	2.21±0.73	2.92±0.26	3.83±0.11	N. D.	N. D.	N. D.
DT	48.37±1.65*	60.23±2.99	14.82±1.93	1.93±0.31	3.48±0.41	4.11±0.09	N. D.	N. D.	N. D.
BH	39.22±2.43*	40.39±4.24	3.37±1.12	0.95±0.08	1.32±0.37	0.94±0.03	2.31±0.37	1.84±0.11	N. D.
BJ	37.11±1.71*	38.45±3.05	4.33±0.95	0.88±0.07	1.26±0.24	0.86±0.04	2.07±0.46	N. D.	N. D.
LY	38.64±1.12*	40.62±2.17	2.16±0.03	0.72±0.03	0.89±0.04	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
LX	35.32±1.46*	41.13±1.84	1.82±0.03	N. D.	0.93±0.07	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
WL	16.26±1.69	11.47±1.19	0.72±0.03	N. D.	0.73±0.06	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
WM	15.17±1.34	10.18±0.13	N. D.	N. D.	0.63±0.02	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
JYD	12.43±1.91	4.89±0.02	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
JYS	15.77±1.24	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
ZG	8.22±0.97	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
ZS	6.72±1.14	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
ZM	3.24±0.73	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
JJ	3.85±0.88	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
JY	5.37±0.94	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
JG	4.27±0.63	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
JD	3.85±0.42	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
GD	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
GX	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
LJ	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
地区 Region	T-2	HT-2	DON	FB1	FB2	FB3	ZEN	D3G	15-ACDON
LW	514.11±7.49*	50.62±2.74	6400.56±23.16*	109445.62±205.73*	81485.74±246.58*	632.93±25.61	2241.43±131.16*	95.66±2.16*	147.55±19.94
LL	486.74±11.04	44.82±2.33	6591.34±22.41*	103463.43±184.86*	80363.65±257.72*	649.46±19.48	2472.62±110.64*	90.18±1.63*	151.42±18.57
QH	N. D.	N. D.	5211.44±16.77*	75329.22±164.65*	14059.72±200.11	284.27±10.37	834.71±91.58	88.54±1.93	95.63±14.63
QX	N. D.	N. D.	5178.28±17.84*	72877.84±186.83*	13262.74±188.04	301.11±11.34	840.15±73.95	79.73±1.28	104.25±15.18
PC	N. D.	N. D.	5311.91±19.15*	64741.36±118.93*	10901.52±163.48	265.42±9.57	764.47±82.07	55.37±2.01	144.33±13.42
PJ	N. D.	N. D.	5201.43±20.79*	56753.91±100.66	10443.63±152.61	244.39±10.21	702.52±11.05	60.91±1.16	154.84±14.29
TW	218.56±8.94	10.96±0.73	5100.75±14.11*	65362.82±125.11*	10033.42±143.53	288.34±11.42	517.16±17.11	35.36±1.93	86.45±7.73
TQ	165.78±4.72	11.73±0.48	5041.36±20.73*	53762.64±137.42	10741.94±122.36	293.47±12.36	433.63±8.74	40.74±1.82	80.22±8.56
DA	N. D.	N. D.	4692.11±18.76	45743.85±104.52	8218.64±142.44	207.38±8.65	401.32±6.87	22.36±1.71	38.27±5.47
DT	N. D.	N. D.	4494.42±15.36	46511.15±79.64	7200.64±163.02	228.38±7.47	290.25±4.65	25.72±2.68	30.18±2.26
BH	N. D.	N. D.	4003.58±16.39	52193.84±167.73	6150.83±134.38	198.56±6.93	252.11±3.48	18.86±1.49	32.63±1.06

续表 Continued Table

地区 Region	T-2	HT-2	DON	FB1	FB2	FB3	ZEN	D3G	15-ACDON
BJ	N. D.	N. D.	3914.43±12.33	46348.92±107.61	5846.85±121.17	188.37±7.04	148.36±5.51	20.18±2.55	37.92±0.83
LY	N. D.	N. D.	3492.87±14.92	47563.47±190.07	2130.83±101.62	206.73±6.83	140.22±4.61	12.14±0.89	N. D.
LX	N. D.	N. D.	3688.22±16.72	47673.88±176.17	2128.93±89.04	196.63±7.48	94.16±6.46	10.36±0.14	N. D.
WL	N. D.	N. D.	1104.52±11.32	1277.32±60.42	177.02±15.93	14.27±0.85	88.38±4.52	N. D.	N. D.
WM	N. D.	N. D.	1391.28±14.51	1287.78±92.53	166.93±10.78	12.11±0.69	14.15±0.77	N. D.	N. D.
JYD	N. D.	N. D.	1336.89±10.47	1068.56±68.19	164.21±12.88	N. D.	15.69±0.46	N. D.	N. D.
JYS	N. D.	N. D.	1583.23±13.85	1075.54±75.03	154.63±5.67	N. D.	18.52±0.68	N. D.	N. D.
ZG	N. D.	N. D.	873.34±10.99	1011.57±95.36	13.22±0.82	N. D.	13.34±0.63	N. D.	N. D.
ZS	N. D.	N. D.	664.21±12.31	1053.31±86.29	12.34±0.73	11.32±0.57	11.56±0.71	N. D.	N. D.
ZM	N. D.	N. D.	523.75±8.93	626.79±54.31	N. D.	N. D.	7.88±0.92	N. D.	N. D.
JJ	N. D.	N. D.	524.66±9.72	604.55±39.82	N. D.	11.83±0.66	6.72±0.59	N. D.	N. D.
JY	N. D.	N. D.	446.35±7.63	425.37±56.06	N. D.	N. D.	5.38±0.14	N. D.	N. D.
JG	N. D.	N. D.	485.52±8.31	558.29±44.72	N. D.	N. D.	5.59±0.31	N. D.	N. D.
JD	N. D.	N. D.	422.36±6.58	317.28±41.48	N. D.	N. D.	5.21±0.07	N. D.	N. D.
GD	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
GX	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
LJ	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

LW: 陇南文县 Wen County, Longnan City; LL: 陇南陇县 Long County, Longnan City; QH: 庆阳环县 Huan County, Qingyang City; QX: 庆阳西峰 Xifeng District, Qingyang City; PC: 平凉崇信 Chongxin County, Pingliang City; PJ: 平凉泾川 Jingchuan County, Pingliang City; TW: 天水武山 Wushan County, Tianshui City; TQ: 天水秦州 Qinzhou District, Tianshui City; DA: 定西安定 Anding District, Dingxi City; DT: 定西通渭 Tongwei County, Dingxi City; BH: 白银会宁 Huining County, Baiyin City; BJ: 白银靖远 Jingyuan County, Baiyin City; LY: 兰州榆中 Yuzhong County, Lanzhou City; LX: 兰州新区 Lanzhou New District; WL: 武威凉州 Liangzhou District, Wuwei City; WM: 武威民勤 Minqin County, Wuwei City; JYD: 金昌东寨 Dongzhai Town, Jinchang City; JYS: 金昌水源 Shuiyuan Town, Jinchang City; ZG: 张掖高台 Gaotai County, Zhangye City; ZS: 张掖山丹 Shandan County, Zhangye City; ZM: 张掖民乐 Minle County, Zhangye City; JJ: 酒泉金塔 Jinta County, Jiuquan City; JY: 酒泉玉门 Yumen City, Jiuquan City; JG: 酒泉瓜州 Guazhou County, Jiuquan City; JD: 酒泉敦煌 Dunhuang City, Jiuquan City; GD: 甘南迭部 Diebu County, Gannan Prefecture; GX: 甘南夏河 Xiahe County, Gannan Prefecture; LJ: 临夏积石山 Jishishan County, Linxia Prefecture. 下同 The same below. “*”表示真菌毒素含量显著超出参考限值($P<0.05$)。“*” indicates that the mycotoxin concentration significantly exceeds the reference limit ($P<0.05$).

2.5 甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中真菌毒素分布状况

如表 5 所示,文县、陇县青贮紫花苜蓿中 18 种真菌毒素均有检出,其中真菌毒素 AFB1、OTA、T-2、DON、FB1、FB2、ZEN 显著超出参考限值($P<0.05$),本次检测中 OTC 真菌毒素全省仅在文县、陇县检出。平凉、庆阳、天水、定西、白银、兰州等地 12 县(区)青贮紫花苜蓿饲料中除 OTC 外,样品中共有 17 种真菌毒素检出,以 AFB1、AFB2、AFG1、AFM1、DON、FB1、FB2、FB3、ZEN、D3G、15-ACDON 含量较高,且部分区域 AFB1、DON、FB1 含量超出参考限值。武威、金昌、张掖、酒泉等地 11 个县(区)青贮紫花苜蓿中检出 AFB1、AFB2、AFG1、AFM1、DON、FB1、FB2、FB3、ZEN 共 9 种真菌毒素,其中 AFB1、DON、FB1、ZEN 真菌毒素含量较高,但均未超出参考限值。而在甘南迭部县、夏河县、临夏积石山地区青贮紫花苜蓿中 18 种真菌毒素均未检出。

通过聚类分析甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中检出率较高的真菌毒素含量,依据各个取样点真菌毒素含量差异值到中心点的欧式距离进行聚类,发现甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量通过聚类分析可以划分为 4 个类,文县、陇县青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量和类型高度相似,归为一类;平凉、庆阳、天水、定西、白银、兰州等 12 个县(区)青贮紫花苜蓿中真菌毒素组成相似,可聚为一类。武威、金昌、张掖、酒泉等地 11 个县(区)可聚为一类,甘南迭部县、夏河县、临夏积石山 3 个县(区)可归为一类(图 4A)。通过对青贮紫花苜蓿中真菌毒素组成区域聚类分布与甘肃 4 个农业划分区进行拟合,结果显示二者高度符合(图 4B)。

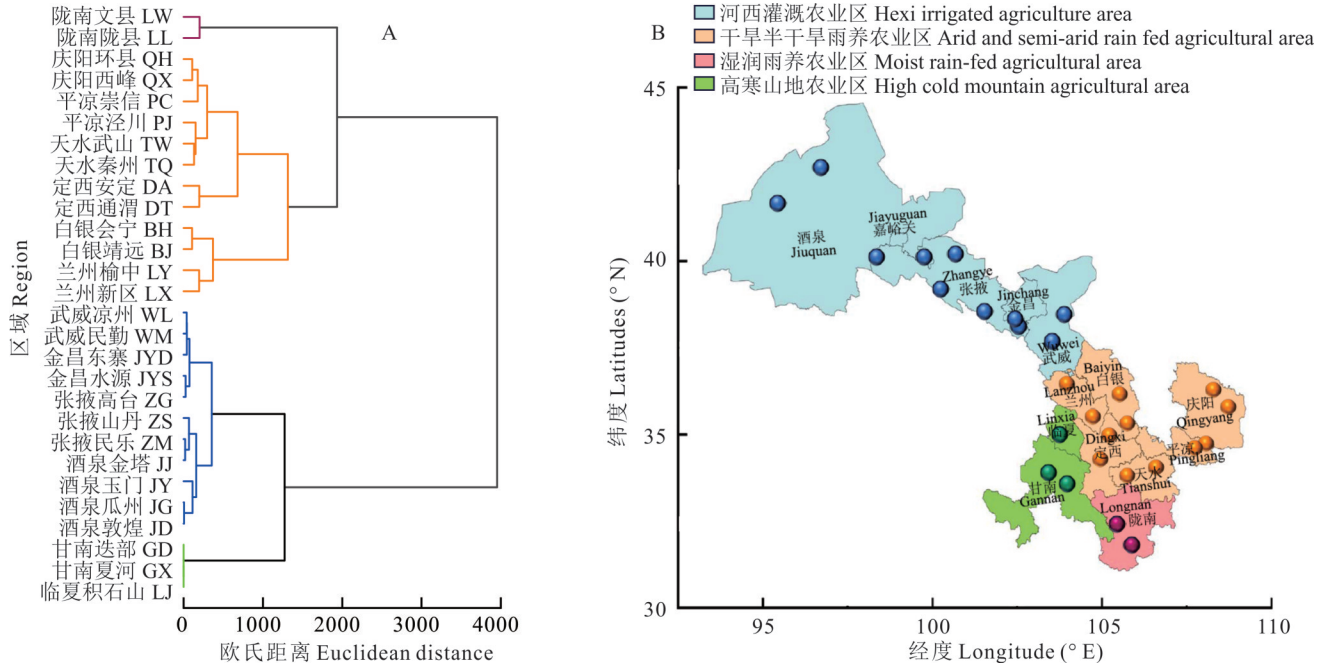


图4 甘肃不同地区青贮紫花苜蓿中真菌毒素特征聚类(A)与农业区域拟合(B)
 Fig. 4 Cluster analysis of mycotoxin characteristics in silage alfalfa from different regions in Gansu (A) and fitting of agricultural regions (B)

基于自然资源部标准地图服务网站GS(2019)3266号标准地图制作,底图边界无修改。The map was created based on the standard map service website of the Ministry of Natural Resources using the standard map No. GS (2019) 3266, with no modifications made to the base map boundaries.

2.6 青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量与地理气候因子的相关性

通过 Pearson 相关性分析(图5),发现检出率较高的真菌毒素含量与经度、纬度、海拔、青贮期最低温度呈负相关,真菌毒素含量与青贮期平均气温、青贮期最高温度、青贮期相对湿度呈正相关。通过地理气候因子与青贮紫花苜蓿原料中检出率较高的真菌毒素进行冗余分析(图6)发现,青贮期平均气温和海拔是影响青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量的重要因素,解释度分别是 59.70% 和 31.20%。

3 讨论

3.1 高分辨质谱法在青贮紫花苜蓿真菌毒素检测中的优势

本研究通过优化 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 质谱条件,对青贮紫花苜蓿中常见真菌毒素,包括 2 种隐蔽型真菌毒素进行检测,18 种真菌毒素的检出限为 0.20~7.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相比较真菌毒素已报道的色谱法检出限为 1.00~30.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [1],质谱法检出限为 0.5~10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [25-26],本方法灵敏度提高了 2~4 倍。同时解决了高效液相色谱法[19,27]、荧光光谱法[25]线性范围小,单次检测成分少的问题;研究发现,液相色谱串联质谱法[16,28]虽然可以同时检测多种成分,但是容易受到检验样品基质影响,产生基质效应影响结果准确性。本

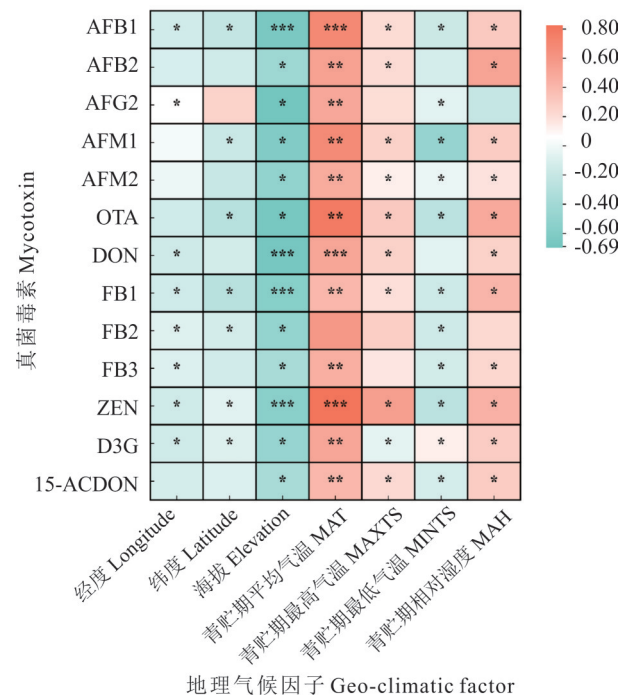


图5 真菌毒素含量与地理气候因子相关性
 Fig. 5 Correlation between mycotoxin content and geo-climatic factors

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

方法选择 GPC 与 SPE 双重净化模式,同时采用基质匹配方式制备标准溶液,有效去除基质效应。之前报道气相色谱法和气相色谱质谱联用法^[7,29]对于沸点高、衍生型的真菌毒素检测不灵敏、出峰易重合,隐蔽型真菌毒素容易造成漏检。本研究选择响应强度高的内源裂解离子作为定性母离子,对重合峰进行高分辨分离,减少干扰,准确检测隐蔽型真菌毒素。本研究检测青贮紫花苜蓿中真菌毒素建立的高分辨质谱法通量大、灵敏度高,高质量分辨率有助于准确检测真菌毒素,同时对结合其他大分子化合物形成的隐蔽型真菌毒素进行结构解析,能精准检测出易漏检、易混淆的隐蔽型真菌毒素。甘肃青贮紫花苜蓿中真菌毒素尤其是隐蔽型真菌毒素检测技术研究,有利于提高饲料及饲料原料中真菌毒素检测结果的准确度与精密性,深入了解青贮饲料中真菌毒素真实污染状况。

3.2 甘肃不同区域真菌毒素污染特征

本研究发现甘肃不同区域检出率较高的真菌毒素分别是 AFB1、AFB2、DON、FB1、FB2、FB3、ZEN。参照文献^[1],252 份样品中有 50.00% 的样品 AFB1 超出限值,AFB1 污染状况最为严重。王琼珊等^[30]、高晶等^[31]对青贮饲料中真菌毒素进行检测研究,也发现 AFB1 超出中国饲料卫生标准限值程度最大,本研究结果与其相似。Fan 等^[12]检测甘肃青贮紫花苜蓿也发现 AFB1 检出率高达 43.4%,污染程度最高。研究还发现甘肃青贮紫花苜蓿中约 33.3% 的样品中有隐蔽型真菌毒素检出,隐蔽型真菌毒素在之前研究中容易漏检易被忽略^[1]。并且甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量具有区域性分布特征,于陇南湿润雨养农业区采集的青贮紫花苜蓿饲料样本中 18 种真菌毒素都有检出,AFB1、OTA、T-2、DON、FB1、FB2、ZEN 真菌毒素均超出参考限值;OTC 真菌毒素仅在陇南湿润雨养农业区有检出。真菌毒素在陇南湿润雨养农业区污染程度最为严重。在陇中、陇东干旱半干旱雨养区的青贮紫花苜蓿饲料中共有 17 种真菌毒素检出。河西干旱灌溉农业区青贮紫花苜蓿中共检出 9 种真菌毒素,以 AFB1、DON、FB1、ZEN 真菌毒素为主,所检出的真菌毒素含量均未超出参考限值。而在高寒山地农业区青贮紫花苜蓿饲料中真菌毒素含量最低,均未检出。可见在不同环境条件下,真菌毒素污染程度不同。在前人所做的同类研究中也发现了类似现象,如张欣昕等^[32]研究中国青贮玉米(*Zea mays*)中真菌毒素污染情况发现,在西南地区真菌毒素检出种类和含量最高,而在西藏地区含量最低。谢瑜杰等^[33]研究也发现湿热的四川等地青贮饲料中真菌毒素含量、种类显著高于中国其他地区。由此可见,青贮紫花苜蓿真菌毒素含量会受环境因素的影响,气候因素相似地区,真菌毒素类型特征相似。

3.3 地理气候因子对青贮紫花苜蓿中真菌毒素的影响作用

真菌毒素是霉菌的次生代谢产物^[34],微生物代谢在湿热地区更活跃,真菌毒素易积累,与青贮环境密不可分。在本研究中甘肃境内 84 处取样点的青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量与类型表现出明显的区域特征,可能与其发酵环境、地理气候条件、农作物管理措施以及微生物种群分布密切相关。由于甘肃不同地理气候区青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量出现区域性的变化特征,因而推测地理气候因素对其产生了一系列的影响。有研究表明^[34],地理区域因素是影响该地区原生微生物群落的主要因素,不同地理气候区域青贮原料表面附生微生物群落组成特征不同,而附生微生物影响青贮过程中微生物群落组成,进而导致青贮过程代谢物差异。本研究团队之前研究结果^[10]也证实,青贮饲料的叶际附生微生物受地理气候因子影响,呈区域性分布特征,不同地理气候条件下青贮原料中微生物群落组成不同。本研究通过 Pearson 相关性分析,发现检出率较高的真菌毒素含量与地理气候因子有相关

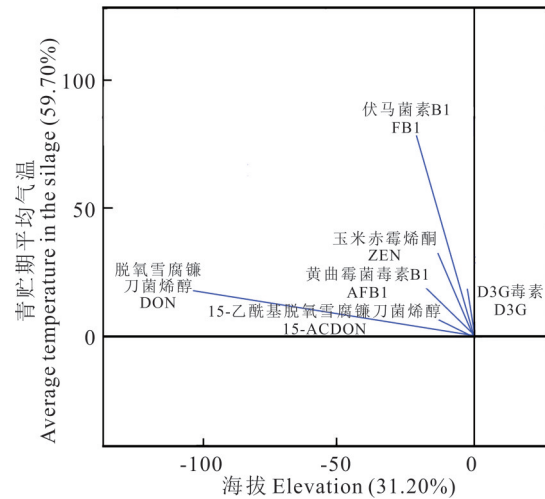


图 6 青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量与气候因子冗余分析

Fig. 6 Redundancy analysis of mycotoxins content in silage alfalfa and climatic factors

性。有研究显示^[6],不同地区青贮饲料中真菌毒素含量差异与当地气温、降水量有很大关系。Dieye等^[35]研究也表明,温度、湿度和其他环境因子对真菌毒素生成具有关键影响,本研究结果与其一致。本研究还通过冗余分析发现,青贮期平均气温和海拔是影响青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量的重要因素之一,解释度分别是59.70%和31.20%。这与李宇宇等^[1]研究发现青贮饲料中真菌毒素含量差异与地理气候中湿度有关系不同,分析原因可能是农作物管理措施,如灌溉等因素弥补了各地区湿度存在的差异。另本研究发现海拔是影响青贮饲料中真菌毒素含量差异的关键因素,因为海拔对微生物群落组成有显著影响。微生物群落复杂多样,在高海拔地区与低海拔地区微生物种群组成不同,高海拔地区由于环境条件特殊,微生物群落的多样性和功能性表现出独特性。在Tang等^[36]的相关研究中就发现青藏高原地区某些微生物可降解黄曲霉毒素,然而这些特殊微生物种群如何影响真菌毒素积累,还需对甘肃不同区域青贮紫花苜蓿中微生物群落进一步研究。

3.4 甘肃紫花苜蓿青贮饲料真菌毒素污染防控对策评述

甘肃作为中国重要的紫花苜蓿种植区,紫花苜蓿青贮饲料在畜牧业中广泛应用。虽然甘肃较多地区青贮紫花苜蓿中真菌毒素都有检出,然而只有少数地区的真菌毒素超出标准限量要求,但是若不长期有效地监控和采取干预措施,紫花苜蓿青贮饲料中真菌毒素污染问题将严重影响青贮紫花苜蓿饲料的质量和动物健康。Bao等^[37]在青贮玉米过程中添加热带醋酸杆菌 AT7 (*Acetobacter tropicalis*) 和植物乳植杆菌 LP64 (*Lactiplantibacillus plantarum*),减少真菌毒素的含量。Wang等^[38]也发现在全株玉米青贮饲料中添加细菌菌剂和控制青贮玉米过程的温湿度,可减少真菌毒素的积累。根据本研究,甘肃地区紫花苜蓿青贮饲料中真菌毒素污染主要是黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素、单端孢霉烯族毒素、伏马毒素以及隐蔽型真菌毒素等多种类型,控制紫花苜蓿青贮过程温度和在青贮过程中添加降解或抑制真菌毒素的微生物菌剂,是减少真菌毒素污染的有效措施。甘肃紫花苜蓿青贮饲料真菌毒素污染问题需要从青贮条件、过程干预、检测监控和政策支持等多方面综合施策。通过科学防控和技术创新,可以有效降低真菌毒素污染,保障饲料安全和畜牧业健康发展。

4 结论

本研究针对青贮紫花苜蓿真菌毒素污染的检测,建立了超高效液相色谱—四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱的方法,通过验证,此方法可高通量、高精度一次性检验青贮紫花苜蓿中18种真菌毒素,尤其是能准确检测青贮紫花苜蓿中容易漏检的隐蔽型真菌毒素。

本研究中,甘肃省内青贮紫花苜蓿中检出率较高的真菌毒素分别是 AFB₁、AFB₂、DON、FB₁、FB₂、FB₃、ZEN,并且在样品检出了隐蔽型真菌毒素 D3G 和 15-ACDON。在甘肃境内的青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量和种类呈明显的区域性特征。其中陇南湿润农业区的青贮紫花苜蓿中真菌毒素污染程度最为严重;陇中、陇东干旱半干旱雨养区青贮紫花苜蓿饲料中共有17种真菌毒素检出,其中3种超出参考限值;河西干旱灌溉农业区的青贮紫花苜蓿中检出9种真菌毒素,均未超出参考限值;高寒山地农业区的青贮紫花苜蓿中18种真菌毒素均未检出。通过 Pearson 相关性和冗余分析,青贮期平均气温和海拔是影响青贮紫花苜蓿中真菌毒素含量及种类的重要因素,其解释度分别达59.70%和31.20%。

参考文献 References:

- [1] Li Y Y, Jia Y S, Ge G T, *et al.* Progress in research on detection, risk assessment and control of mycotoxins in forage products. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(4): 191–204.
李宇宇, 贾玉山, 格根图, 等. 饲用草产品主要真菌毒素污染检测、风险评估与控制研究进展. *草业学报*, 2021, 30(4): 191–204.
- [2] Van Der Fels-Klerx H J, Adamse P, Punt A, *et al.* Data analyses and modelling for risk based monitoring of mycotoxins in animal feed. *Toxins*, 2018, 10(2): 234–245.
- [3] Lei Y P, Zhou J C, Zheng W G, *et al.* A survey report on the mycotoxin contamination of compound feed and its raw materials of China in 2019–2020. *Feed Industry*, 2022, 43(20): 59–64.
雷元培, 周建川, 郑文革, 等. 2019–2020年中国饲料原料和饲料中霉菌毒素污染调查报告. *饲料工业*, 2022, 43(20):

59—64.

- [4] Ling W Q, Zhang L, Li Y, *et al.* Effects of *Lentilactobacillus buchneri* combined with different sugars on nutrient composition, fermentation quality, rumen degradation rate, and aerobic stability of alfalfa silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(7): 122—134.
凌文卿, 张磊, 李珏, 等. 布氏乳杆菌和不同糖类联用对紫花苜蓿青贮营养成分、发酵品质、瘤胃降解率及有氧稳定性的影响. *草业学报*, 2023, 32(7): 122—134.
- [5] Guo Y P, Zhao L H, Ma Q G, *et al.* Novel strategies for degradation of aflatoxins in food and feed: A review. *Food Research International*, 2021, 140: 351—366.
- [6] Tang Y Q, Pan Y Y, Liu C D, *et al.* Advances in understanding the biotransformation of deoxynivalenol and its masked forms. *Food Science*, 2020, 41(19): 281—289.
唐语谦, 潘药银, 刘晨迪, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的生物转化及其隐蔽型毒素的形成研究进展. *食品科学*, 2020, 41(19): 281—289.
- [7] Abdolmaleki K, Khedri S, Alizadeh L, *et al.* The mycotoxins in edible oils: An overview of prevalence, concentration, toxicity, detection and decontamination techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 115: 500—511.
- [8] Du S, Liu H, You S H, *et al.* Effects of baling density and stacking method on chemical composition and mycotoxin levels of native hay. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(7): 143—150.
都帅, 刘昊, 尤思涵, 等. 打捆密度和堆垛方式对天然草地青干草化学成分和真菌毒素的影响. *草业学报*, 2019, 28(7): 143—150.
- [9] Yuan X J, Yang X, Wang W B, *et al.* The effects of natamycin and hexanoic acid on the bacterial community, mycotoxins concentrations, fermentation profiles, and aerobic stability of high moisture whole-crop corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 2022, 286: 1081—1095.
- [10] Tang Y, Liu X J, Zhao Y J, *et al.* Characteristics and driving factors of lactic acid bacteria communities in silage made from alfalfa in different regions of Gansu Province. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(2): 112—124.
唐璎, 刘晓静, 赵雅姣, 等. 甘肃不同区域青贮紫花苜蓿乳酸菌群落特征及其驱动因子研究. *草业学报*, 2024, 33(2): 112—124.
- [11] Ben Z L, Jin H X, Wu X J, *et al.* Leaf nutritional traits of alfalfa at the reproductive stage and their correlations with seed yield under different irrigation and nitrogen fertilization levels in the oasis area of the Hexi Corridor. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(1): 94—106.
本转林, 金慧兴, 吴晓娟, 等. 河西走廊绿洲区灌溉和施氮肥下苜蓿生殖期叶片养分特性及其与种子产量的关联. *草业学报*, 2025, 34(1): 94—106.
- [12] Fan X M, Zhao S S, Yang F Y, *et al.* Effects of lactic acid bacterial inoculants on fermentation quality, bacterial community, and mycotoxins of alfalfa silage under vacuum or nonvacuum treatment. *Microorganisms*, 2021, 9(12): 1041—1055.
- [13] Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, *et al.* Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 215: 165—180.
- [14] Ghilardelli F, Barbato M, Gallo A. A preliminary study to classify corn silage for high or low mycotoxin contamination by using near infrared spectroscopy. *Toxins*, 2022, 14(5): 623—635.
- [15] Driehuis F, Wilkinson J M, Jiang Y, *et al.* Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 4093—4110.
- [16] Liu W J, Huang B, Fu J W, *et al.* Simultaneous determination of 16 mycotoxin residues in aged tea by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Science*, 2021, 42(2): 299—305.
刘文静, 黄彪, 傅建炜, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定陈年老茶中16种真菌毒素残留. *食品科学*, 2021, 42(2): 299—305.
- [17] Liu Y X, Gao P C, Zhan Z L, *et al.* Rapid detection of zearalenone in coicis semen based on ELISA. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(11): 2919—2924.
刘云翔, 高鹏超, 詹志来, 等. 基于酶联免疫分析的中药薏苡仁玉米赤霉烯酮残留快速检测技术研究. *中国中药杂志*, 2023, 48(11): 2919—2924.
- [18] Fan Z C, Han Z, Guo W B, *et al.* Simultaneous determination of 30 mycotoxins in different feed products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(6): 627—633.
范志辰, 韩铮, 郭文博, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定不同饲料中30种真菌毒素. *色谱*, 2017, 35(6):

627—633.

- [19] Cao S, Hu M, Yang L, *et al.* Chemical constituent analysis of *Ranunculus sceleratus* L. using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Molecules*, 2022, 27(10): 538—550.
- [20] Haq I U, Taj R, Nafees M, *et al.* Mycotoxin detection in selected medicinal plants using chromatographic techniques. *Biomedical Chromatography*, 2024, 38(4): 646—660.
- [21] Cao Y M, Zhou H, Lan L, *et al.* A rapid screening method for 193 pesticide residues in 3 traditional Chinese medicines containing alkaloids by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2022, 24(4): 859—871.
曹依敏, 周恒, 兰岚, 等. 超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速测定3种含生物碱类中药材中193种农药残留. *农药学学报*, 2022, 24(4): 859—871.
- [22] Feng F, Chang Q Z, Sun X, *et al.* Rapid determination of 107 illegally added nafils in foods by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Food Science*, 2025, 46(10): 290—298.
冯峰, 常启智, 孙晓, 等. 超高效液相色谱—高分辨质谱法快速测定食品中107种那非类非法添加物. *食品科学*, 2025, 46(10): 290—298.
- [23] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, China National Standardization Administration Committee. Determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in feed-immunoaffinity column purification-high-performance liquid chromatography method: GB/T 30955-2014. Beijing: Standards Press of China, 2014.
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的测定免疫亲和柱净化—高效液相色谱法: GB/T 30955-2014. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [24] Yuan X, Li J, Dong Z, *et al.* The reconstitution mechanism of napier grass microiota during the ensiling of alfalfa and their contributions to fermentation quality of silage. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 874—887.
- [25] Yang Z R, Li L, Wu Q, *et al.* Rapid determination of aflatoxin B1 in corn meal by light-emitting diode excited fluorescence spectrometry after pyridine tribromide derivatization. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2023, 59(4): 448—452.
杨卓燃, 李龙, 吴琼, 等. 三溴化吡啶衍生—发光二极管激发的荧光光谱法快速测定玉米粉中黄曲霉毒素B1的含量. *理化检验—化学分册*, 2023, 59(4): 448—452.
- [26] Patyal A, Gill J P S, Bedi J S, *et al.* Assessment of aflatoxin contamination in dairy animal concentrate feed from Punjab, India. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(28): 37705—37715.
- [27] Mao J, Zheng N, Wen F, *et al.* Multi-mycotoxins analysis in raw milk by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Food Control*, 2018, 84: 305—311.
- [28] Fu J H, Yang L F, Dong Z M, *et al.* The matrix effect research of determination of 16 mycotoxins by UPLC-Quadrupole/Qtrap mass spectrometry in 25 kinds of feed and feedstuff samples. *Chinese Feed*, 2019(21): 66—71.
符金华, 杨琳芬, 董泽民, 等. 饲料和饲料原料等25种样品中16种真菌毒素超高效液相色谱—三重四级杆/线性离子阱串联质谱法基质效应的研究. *中国饲料*, 2019(21): 66—71.
- [29] Sebaei A S, Youssif M I, Abdel-Maksoud G A. Determination of seven illegal dyes in Egyptian spices by HPLC with gel permeation chromatography clean up. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2019, 84: 263—277.
- [30] Wang Q S, Zhao Y R, Wang X. Research on the contamination of ochratoxin a in feed and its detection technologies. *Quality and Safety of Agricultural Products*, 2019(5): 40—43.
王琼珊, 赵亚荣, 王旭. 饲料中赭曲霉毒素A污染及其检测技术研究. *农产品质量与安全*, 2019(5): 40—43.
- [31] Gao J, Yuan J Z, Hou F J, *et al.* Research advances on the detection of aflatoxins in feed and dairy products. *Pratacultural Science*, 2018, 35(1): 222—231.
高晶, 袁建振, 侯扶江, 等. 饲料及乳制品中黄曲霉毒素的检测. *草业科学*, 2018, 35(1): 222—231.
- [32] Zhang X X, Zhang F J, Zhang Y, *et al.* Analysis of mycotoxin contamination and animal health risk assessment in silage corn of China. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(12): 4451—4459.
张欣昕, 张福金, 张尧, 等. 中国青贮玉米中霉菌毒素的污染情况分析与动物健康风险评估. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(12): 4451—4459.
- [33] Xie Y J, Chen H, Peng T, *et al.* Research progress on the detection techniques of mycotoxins in food and forage. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(6): 1234—1246.
谢瑜杰, 陈辉, 彭涛, 等. 食品与饲料基质中真菌毒素检测技术研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(6): 1234—

1246.

- [34] Dong Z, Shao T, Li J, *et al.* Effect of alfalfa microbiota on fermentation quality and bacterial community succession in fresh or sterile Napier grass silages. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 4288–4301.
- [35] Dieye C A T, Durand N, Schorr-Galindo S, *et al.* Impacts of abiotic factors on the growth of three commercial biological control agents, on the growth and mycotoxin genesis of *Fusarium gramine arum* and on their interaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 104(2): 932–941.
- [36] Tang Y, Liu X, Dong L, *et al.* Screening and identification of an aflatoxin B1-degrading strain from the Qinghai–Tibet Plateau and biodegradation products analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 104(2): 932–941.
- [37] Bao Y, Dong T, Shao T, *et al.* Antifungal and mycotoxin detoxification potentials of *Acetobacter tropicalis* AT7 and *Lactiplantibacillus plantarum* LP64 in whole-plant corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 2024, 313(2): 863–876.
- [38] Wang W, Cai X, Shao T, *et al.* Effects of bacterial inoculants on the microbial community, mycotoxin contamination, and aerobic stability of corn silage infected in the field by toxigenic fungi. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2022, 9(1): 365–379.